

FERMENTASI BIOETANOL DARI NIRA NIPAH KENTAL SECARA SEMI SINAMBUNG DENGAN PENAMBAHAN ERGOSTEROL

VERY HIGH GRAVITY FED BATCH FERMENTATION OF BIOETHANOL FROM NYPA SAP WITH ERGOSTEROL SUPPLEMENTATION

Benhard F Situmorang¹, Fajar Restuhadi² and Evy Rossi²

Program Studi Teknologi Hasil Pertanian, Jurusan Teknologi Pertanian, Fakultas Pertanian, Universitas Riau, Kode Pos 28293, Indonesia

benhard.fajar@gmail.com

ABSTRACT

The aim of the research was to obtain the best combination treatment between ergosterol concentration and sugar concentration 250 g/l; *Tween80* 0,2%. *Tween80* and ergosterol as surfactant and nutrition for *Saccaromyces cerevisiae* to produce ethanol on very high gravity fed batch fermentation from Nypa sap. The exploration research used four treatments with duplicate measurements. Treatments consist of E0 (ergosterol 0 mg/l), E1 (ergosterol 18 mg/l), E2 (ergosterol 24 mg/l) and E3 (ergosterol 30 mg/l). Observation was conducted every 24 hours to sugar concentration, ethanol concentration, amount of cell, and pH. The best combination treatment was E1 (*Tween80* 0.2%; sugar 250 g/l and ergosterol 18 mg/l) which produced ethanol 17,57%.

Keywords: Nypa sap, Tween80, Ergosterol, fed batch, Bioethanol, Very High Gravity Fermentation

PENDAHULUAN

Bahan bakar dari minyak bumi jika terus menerus dikonsumsi tanpa adanya bahan bakar pengganti maka akan terjadi kelangkaan bahan bakar. Perlu adanya bahan bakar alternatif sebagai sumber energi untuk mengatasi hal ini. Bioetanol (C_2H_5OH) merupakan senyawa organik yang memiliki peluang besar menjadi pengganti bahan bakar minyak bumi.

Menurut Tamunaidu *et al.* (2011) nira nipah berpotensi untuk menghasilkan 15.600 liter bioetanol per hektar, atau dua kali lipat hasil yang diperoleh dari tebu, dan enam kali lipat hasil dari jagung. Menurut Restuhadi *et al.* (2012) potensi tanaman nipah (*Nypa Fruticans*)

yang melimpah di Kabupaten Bengkalis, menarik perhatian Ditjen Energi Baru, Terbarukan Dan Konservasi Energi, Kementerian ESDM, sehingga pada tahun 2011 dibangun dua unit *pilot plant* bioetanol berbahan baku nira nipah dengan kapasitas terpasang 300L/hari, di Desa Lubuk Muda dan sisanya di Desa Pambang, Kabupaten Bengkalis.

Mengingat lokasi hutan nipah sebagai sumber bahan baku yang umumnya merupakan daerah rawa, maka proses pengumpulan nira nipah dari lokasi sentra penyadapan ke tempat pengolahan relatif cukup berat. Tidak jarang nira yang terkumpul telah terfermentasi menjadi asam, sehingga menurunkan

1. Mahasiswa Teknologi Pertanian

2. Dosen Pembimbing Mahasiswa Teknologi Pertanian

kualitas nira dan produktivitas jika diolah menjadi bioetanol. Strategi yang ditawarkan dalam kegiatan ini adalah kajian terhadap kelayakan teknis dan teknologi dengan melakukan sejumlah eksperimen untuk mendapatkan kondisi fermentasi optimum dengan memperkenalkan proses fermentasi nira kental (*very high gravity/VHG fermentation*).

Very high gravity adalah proses fermentasi dengan menggunakan medium yang mengandung kadar gula yang tinggi, mencapai sekitar 250 g/l (Dziugan *et al.*, 2013). *Very High Gravity fermentation* ini memiliki sejumlah keunggulan, seperti meningkatkan konsentrasi etanol yang dihasilkan dan juga meningkatkan laju fermentasi, sehingga dapat mengurangi biaya produksi dan mengurangi resiko kontaminasi oleh mikroba lain (Liu *et al.*, 2011). Menurut Casey *et al.* (1984) faktor pembatas yang menghambat produksi etanol adalah defisiensi nutrisi. Penambahan lipid, terutama ergosterol dan asam lemak tak jenuh memberikan efek yang signifikan terhadap pertumbuhan dan metabolisme sel ragi bebas (Guimaraes *et al.*, 2006). Sterol dan asam lemak tak jenuh merupakan komponen penting bagi membran sel, umumnya tidak banyak terkandung di dalam media nira kental, sehingga perlu ditambahkan untuk meningkatkan kinerja metabolisme sel (Boulton dan Quain, 2001).

Beberapa penelitian telah dilakukan untuk menghasilkan bioetanol dari beberapa sumber. Chandel *et al.* (2006) menggunakan teknologi *fed batch* dengan memanfaatkan tanaman *Typa*

latifolia yang banyak terdapat di India. Hasil yang diperoleh pada sistem *fed batch* sebesar $28,5 \pm 0,46$ g/l (3,59% v/v). Hasil yang diperoleh pada sistem *fed batch* lebih tinggi dibandingkan dengan sistem *batch* yaitu $9,74 \pm 0,1$ g/l (1,23% v/v). Laopaiboon *et al.* (2007) menggunakan sorghum untuk produksi bioetanol secara *batch* dan *fed batch*. Hasil yang diperoleh yaitu sistem *fed batch* lebih efisien bila dibandingkan dengan sistem *batch* dalam produksi bioetanol. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengembangkan biokonversi nira nipah menjadi bioetanol dengan teknik fermentasi media kental untuk mengurangi resiko terkontaminasinya bahan baku nira nipah, meningkatkan produksi bioetanol dan untuk melihat pengaruh kadar ergosterol dengan proses fermentasi pembentukan bioetanol secara semi sinambung (*fed batch*).

BAHAN DAN METODE

Tempat dan Waktu

Penelitian ini telah dilakukan di Laboratorium Pengolahan Hasil Pertanian, Laboratorium Analisis Hasil Pertanian Fakultas Pertanian dan Laboratorium Bioproses Fakultas Teknik Universitas Riau. Waktu penelitian berlangsung selama lima bulan yaitu sekitar bulan Juni hingga bulan Oktober 2014.

Bahan dan Alat

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah nira nipah, *Tween80*TM, ergosterol, ragi roti *saft instant*, glukosa, alkohol 70%, akuades dan garam fisiologis. Bahan-bahan yang digunakan untuk analisis adalah glukosa anhidrat, Na₂CO₃, Kalium-natrium-tartrat,

NaHCO₃, Na₂SO₄, H₂SO₄ 96%, CuSO₄.5H₂O, amonium molibdat, dan Na₂AsO₄.7H₂O.

Alat-alat yang digunakan adalah erlenmeyer, gelas ukur, corong, pipet ukur, labu ukur, tabung reaksi, kuvet, dan pipet tetes. Peralatan analisis yaitu pH meter, alkohol meter, spektrofotometer, *haemocytometer* dan *rotary evaporator*. Alat-alat lainnya seperti, timbangan analitik, sentrifuse, *water bath shaker*, spatula, *autoclave*, mikro pipet, tip, *automatic mixer*, jarum ose, kapas penutup, aluminium foil, *hot plate*, *magnetic stirrer*, pompa suntikan, kertas saring, inkubator, kompor gas, oven pengering, *laminar flow cabinet*, saringan, lampu spiritus, lemari es (*refrigerator*), kamera, peralatan tulis dan alat lainnya.

Metode Penelitian

Penelitian dilaksanakan secara eksperimen untuk melihat fenomena pengaruh beberapa kombinasi kadar ergosterol dengan proses fermentasi pembentukan bioetanol secara semi sinambung. Pengukuran dilakukan secara duplo (dua kali pengulangan) setiap hari hingga hari keenam untuk beberapa parameter pengamatan yaitu kadar etanol, kadar gula, jumlah sel dan perubahan pH. Kadar gula dari medium fermentasi dibuat supaya menjadi konstan (250 g/l) dengan cara penambahan gula sesuai dengan kadar gula yang diharapkan (250 g/l). Perlakuan pada penelitian ini adalah sebagai berikut :

E1 = Gula 250 g/l; Ergosterol 0 mg/l; Tween80TM 0,2 % dari medium nira nipah

E2 = Gula 250 g/l; Ergosterol 18 mg/l; Tween80TM 0,2 % dari medium nira nipah

E3 = Gula 250 g/l; Ergosterol 24 mg/l; Tween80TM 0,2 % dari medium nira nipah

E4 = Gula 250 g/l; Ergosterol 30 mg/l; Tween80TM 0,2 % dari medium nira nipah

Pelaksanaan Penelitian

Penelitian ini akan dilakukan dengan proses fermentasi nira nipah kental secara semi sinambung dengan menggunakan sel bebas *Saccharomyces cerevisiae*.

Sterilisasi Peralatan

Semua peralatan yang akan digunakan dibersihkan terlebih dahulu dengan cara mencuci peralatan dengan sabun sampai bersih, kemudian dilakukan pengeringan di dalam oven pengering. Setelah dikeringkan peralatan yang terbuat dari kaca disterilkan dalam *autoclave* pada suhu 121°C selama 15 menit dengan tekanan 15 psi. Tabung reaksi terlebih dahulu ditutup menggunakan kapas dan aluminium foil, gelas ukur, pipet tetes kaca, spatula, erlemeyer dan peralatan kaca dibungkus menggunakan koran dan plastik. Peralatan yang terbuat dari plastik disterilkan dengan cara menyemprotnya dengan alkohol 70%.

Penyiapan Medium Fermentasi Nira Nipah Kental (250 g/l)

Nira Nipah yang telah disadap dan dipanaskan di uji kadar gula reduksi dengan metode Nelson Somogyi (Sudarmadji *et al.*, 1997), jika kadar glukosa belum 250 g/l maka dilakukan pemanasan sekitar tiga jam pada nira nipah agar air menguap sehingga diperoleh nira nipah kental dengan konsentrasi glukosa 250 g/l.

Inokulasi Sel *Saccharomyces cerevisiae*

Pembuatan *starter* yaitu dengan menyiapkan substrat nira nipah kental sebanyak 200 ml (10% dari total medium fermentasi) sebagai medium pengembang *starter*, lalu tambahkan *Tween 80*TM dan ergosterol sesuai masing-masing perlakuan ke dalam medium pengembang yang digunakan sama dengan medium yang akan difermentasikan dengan pH lima. *Starter* tersebut disterilkan dalam *autoclave* selama 15 menit pada suhu 121°C dan tekanan 15 psi. Kemudian medium pengembang *starter* didinginkan sampai suhu 27°C. Selanjutnya ditambahkan ragi roti dengan merk *saft instant* ke dalam substrat fermentasi sebanyak empat gram untuk medium fermentasi dua liter secara aseptis, kemudian diaduk hingga merata (homogen). *Starter* didiamkan selama satu hari sebelum dipakai untuk fermentasi nira nipah kental secara semi sinambung.

Fermentasi Semi Sinambung

Media nira nipah dengan kadar gula dan konsentrasi *Tween80*TM sesuai perlakuan terbaik pada penelitian Azizah (2014) yaitu kadar gula 250 g/l dan konsentrasi *Tween80*TM 0,2% dari nira nipah. Dimasukkan ke dalam erlenmeyer berkapasitas dua liter, selanjutnya ditambahkan ergosterol sesuai perlakuan. Menurut Tran *et al.* (2010) dan Pham *et al.* (2010) kadar optimum ergosterol adalah 18 mg/l dan 24 mg/l. Sehingga kombinasi kadar ergosterol pada penelitian ini adalah 0 mg/l, 18 mg/l, 24 mg/l dan 30 mg/l.

Media tersebut diatur pHnya menjadi lima, karena pH optimum di awal fermentasi bioetanol adalah

lima. Media nira nipah distrelisasi di dalam *autoclave* pada suhu 121°C, tekanan 15 psi selama 15 menit kemudian media didinginkan hingga suhu kamar. Dimasukkan starter *saccharomyces cerevisiae* sebanyak 10% dari total media fermentasi ke dalam media fermentasi dalam keadaan aseptis. Setelah itu media nira nipah kental difermentasi pada suhu 27°C secara semi sinambung (*fed batch*) selama enam hari. Pengukuran dilakukan setiap hari hingga hari keenam untuk beberapa parameter pengamatan yaitu kadar etanol, kadar glukosa, jumlah sel dan perubahan pH. Kadar gula dari media fermentasi dibuat supaya menjadi konstan (250 g/l) dengan cara penambahan glukosa sesuai dengan konsentrasi glukosa yang diharapkan yaitu 250 g/l. Jumlah sampel yang diambil setiap hari dari medium fermentasi untuk analisis harus sama dengan jumlah substrat segar yang ditambahkan ke dalam medium fermentasi. Pemisahan bioetanol dilakukan setelah pengambilan sampel setiap hari hingga hari keenam menggunakan *rotary evaporator*. Sampel yang diambil sekitar 200 ml per hari.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Jumlah Konsumsi Gula

Jumlah konsumsi gula relatif sama pada masing-masing perlakuan dikarenakan jumlah *Tween80*TM sama pada tiap perlakuan yaitu 0,2%. *Tween80*TM berperan sebagai surfaktan dapat mengurangi efek negatif yang diakibatkan peristiwa osmosis. Namun pada proses fermentasi semi sinambung pada penelitian ini masih terjadi *osmotic shock*. Konsentrasi *Tween80*TM seharusnya diubah-ubah karena dilakukan penambahan gula setiap

hari serta untuk melihat kombinasi *Tween80*TM dan ergosterol yang terbaik. Penambahan ergosterol lebih berpengaruh pada pertumbuhan dan

perbaikan sel yang rusak serta produksi etanol. Jumlah konsumsi gula (g/l) dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Jumlah konsumsi gula (g/l)

Hari	E0 Gula (g/l)	E1 Gula (g/l)	E2 Gula (g/l)	E3 Gula (g/l)
1	20.05	46.50	24.12	31.58
2	24.12	38.36	35.65	37.69
3	39.04	48.54	46.50	26.83
4	56.68	66.85	56.68	57.35
5	37.01	34.29	33.61	35.65
6	32.26	29.54	30.22	23.44
Total	209.14	264.08	226.77	212.53

Setelah diketahui jumlah konsumsi gula dari media fermentasi seperti pada Tabel 1. Kemudian ditambahkan gula sebanyak jumlah gula yang berkurang agar tetap konstan (250 g/l). Jumlah gula yang ditambah mengacu pada rumus di bawah ini.

$$T = \frac{(V2 \times N2) - (V1 \times N1)}{X}$$

Keterangan :

T = Kadar gula yang ditambah (g/l)

V1 = Jumlah media fermentasi yang sisa (ml)

V2 = Jumlah total media fermentasi (ml)

N1 = Kadar gula media fermentasi setelah diukur (g/l)

N2 = Kadar gula konstan (250 g/l)

X = Jumlah sampel yang diambil (ml)

Hubungan Antara Jumlah Konsumsi Gula dan Jumlah Sel

Pembuatan bioetanol pada penelitian ini menggunakan *Saccharomyces cerevisiae*. Proses fermentasi bioetanol melibatkan reaksi oksidasi gula sederhana dalam kondisi anaerob dan dibagi menjadi

dua fase yaitu proses oksidasi gula dan proses metabolisme piruvat (Drapcho *et al.*, 2008).

Berdasarkan data pada Tabel 1 dapat dilihat hubungan antara jumlah konsumsi gula dan jumlah sel saling berkaitan hingga akhir fermentasi. Jika jumlah sel bertambah maka jumlah konsumsi gula juga bertambah. Gula yang berkurang dimanfaatkan sel dan dikonversi menjadi etanol. Selain etanol gula juga diubah menjadi asam-asam organik meskipun dalam jumlah sedikit. Peningkatan jumlah sel pada fermentasi hari keempat terjadi karena sel mengalami fase pertumbuhan cepat. Fase pertumbuhan cepat ini membutuhkan gula dalam jumlah yang banyak untuk tumbuh, oleh sebab itu jumlah konsumsi gula tertinggi juga terjadi pada hari keempat. Tabel hubungan antara jumlah konsumsi gula dan jumlah sel dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Tabel hubungan antara jumlah konsumsi gula dan jumlah sel/ml

Hari	Jumlah konsumsi gula (g/l)				Jumlah sel/ml $\times 10^7$			
	E0 Gula	E1 Gula	E2 Gula	E3 Gula	E0 Sel	E1 Sel	E2 Sel	E3 Sel
1	20,05	46,50	24,12	31,58	184,00	230,67	220,00	218,67
2	24,12	38,36	35,65	37,69	106,67	84,00	84,00	100,00
3	39,04	48,54	46,50	26,83	72,00	88,00	92,00	108,00
4	56,68	66,85	56,68	57,35	172,00	136,00	129,33	109,33
5	37,01	34,29	33,61	35,65	64,00	60,00	74,67	69,33
6	32,26	29,54	30,22	23,44	62,67	68,00	64,00	64,00

*Tween 80*TM berperan sebagai surfaktan yang dapat menurunkan tegangan permukaan disekitar sel (Feng *et al.*, 2006), sehingga sel tidak perlu menyerap gula dalam jumlah yang banyak guna untuk membentuk kondisi isotonik antara di dalam dan di luar sel. Peran *Tween80*TM belum terlihat hingga fermentasi hari kedua. *Osmotic shock* pada sel masih terjadi pada fermentasi semi sinambung hingga hari kedua. *Osmotic shock* terjadi akibat ditambahkan gula setiap hari ke dalam medium fermentasi agar kadar gula medium fermentasi tetap konstan (250 g/l) sehingga gula yang melimpah dimanfaatkan oleh sel untuk membentuk kondisi isotonik antara di dalam dan di luar sel.

Hubungan Antara Jumlah Konsumsi Gula dan Kadar Etanol

Gula merupakan bahan baku utama yang akan dirombak sel *Saccharomyces cerevisiae* untuk dijadikan etanol. Berdasarkan teori, setiap 1 g gula akan menghasilkan 0,511 g etanol, namun hal ini tidak terjadi pada praktiknya karena tidak semua gula dimanfaatkan oleh sel untuk diubah menjadi etanol. Selain untuk menghasilkan etanol, *Saccharomyces cerevisiae* juga memanfaatkan gula untuk pertumbuhan sel, pemeliharaan sel, dan menghasilkan produk lainnya seperti gliserol, asam asetat, asam laktat, dan asam suksinat (Draphco *et al.*, 2008). Hubungan antara jumlah konsumsi gula (g/l) dan kadar etanol (%) dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Tabel hubungan antara jumlah konsumsi gula dan kadar etanol

Hari	Jumlah konsumsi gula (g/l)				Kadar etanol (%)			
	E0 Gula	E1 Gula	E2 Gula	E3 Gula	E0 Etanol	E1 Etanol	E2 Etanol	E3 Etanol
1	20,05	46,50	24,12	31,58	4,16	6,32	5,29	4,02
2	24,12	38,36	35,65	37,69	6,00	8,97	6,33	6,32
3	39,04	48,54	46,50	26,83	6,25	10,56	6,47	7,69
4	56,68	66,85	56,68	57,35	7,29	11,66	9,32	9,32
5	37,01	34,29	33,61	35,65	10,78	13,04	12,22	13,82
6	32,26	29,54	30,22	23,44	13,88	17,56	15,38	14,70

Berdasarkan Tabel 2 gula yang dikonsumsi sel pada fermentasi semi sinambung tidak semuanya dirombak menjadi etanol. Fermentasi pada hari keempat menunjukkan konsumsi gula yang paling tinggi dari antara semua perlakuan. Namun kadar etanol terus meningkat mulai dari hari pertama hingga hari keenam, kadar etanol tertinggi dihasilkan pada fermentasi hari keenam bukan pada fermentasi hari keempat. Ergosterol memberikan pengaruh terhadap peningkatan kinerja sel *Saccharomyces cerevisiae* sehingga kadar etanol pada perlakuan E1, E2 dan E3 lebih tinggi daripada perlakuan E0 (tanpa ergosterol). Hal tersebut sesuai dengan pernyataan Boulton dan Quain (2001) bahwa penambahan ergosterol dapat meningkatkan kinerja metabolisme sel. Hasil ini tidak berbeda jauh dari penelitian yang telah dilakukan Tran *et al.* (2010) yang menghasilkan etanol sebesar 22,2% dengan penambahan Tween80TM pada konsentrasi 0,3% dan ergosterol 18 mg/l.

Hubungan Antara Jumlah Sel dan Kadar Etanol

Perhitungan jumlah sel mikroba dilakukan untuk mengetahui

ketahanan sel bebas pada saat fermentasi secara semi sinambung berlangsung. Sel bebas diharapkan dapat memanfaatkan nutrisi hanya untuk menghasilkan produk yaitu etanol bukan untuk menghasilkan biomassa. Sel bebas juga diharapkan lebih tahan terhadap senyawa penghambat maupun senyawa yang dihasilkan dari hasil fermentasi karena penambahan nutrisi dilakukan setiap hari.

Jumlah mikroba pada fermentasi hari pertama yang tinggi tidak menghasilkan etanol yang tinggi. Sel *Saccharomyces cerevisiae* pada fermentasi hari pertama tidak menghasilkan kadar etanol yang tinggi dikarenakan sel mengkonsumsi gula guna untuk membentuk keadaan isotonik di dalam dan di luar sel. Peran ergosterol terlihat menjelang akhir fermentasi, jumlah sel yang semakin menurun namun kadar etanol semakin meningkat. Kemungkinan peran ergosterol akan semakin terlihat jika waktu fermentasi diperpanjang, kadar etanol akan semakin tinggi. Hubungan antara jumlah sel dan kadar etanol dapat dilihat pada Tabel 3 berikut.

Tabel 3. Tabel hubungan antara jumlah sel dan kadar etanol

Hari	Jumlah sel/ml $\times 10^7$				Kadar etanol (%)			
	E0 Sel	E1 Sel	E2 Sel	E3 Sel	E0 Etanol	E1 Etanol	E2 Etanol	E3 Etanol
1	184,00	230,67	220,00	218,67	4,17	6,32	5,29	4,02
2	106,67	84,00	84,00	100,00	6,00	8,97	6,34	6,32
3	72,00	88,00	92,00	108,00	6,25	10,56	6,47	7,69
4	172,00	136,00	129,33	109,33	7,29	11,67	9,32	9,32
5	64,00	60,00	74,67	69,33	10,78	13,04	12,22	13,83
6	62,67	68,00	64,00	64,00	13,89	17,57	15,38	14,71

KESIMPULAN DAN SARAN

*Tween80*TM yang berperan sebagai penurun tegangan permukaan tidak terlalu terlihat pada penelitian ini. Penambahan gula dilakukan setiap hari mengakibatkan sel mengalami *osmotic shock*. Ergosterol sebagai komponen utama membran plasma yang berperan penting dalam regulasi osmotik, penyerapan nutrisi, ekskresi dan biosintesis dinding sel. Ergosterol berperan dalam meningkatkan kinerja sel untuk meningkatkan kadar etanol. *Tween80*TM sebesar 0,2% (v/v) dan ergosterol 18 mg/l dengan konsentrasi gula media fermentasi sebesar 250 g/l menghasilkan kadar etanol tertinggi pada akhir fermentasi hari ke-6 yaitu sebesar 17,57%.

Penelitian lanjutan perlu dilakukan mengkombinasikan antara *Tween80*TM dengan ergosterol sebagai sumber asam lemak dan nutrisi bagi mikroorganisme. Fermentasi dilaksanakan secara semi sinambung dalam jangka waktu fermentasi yang lebih lama agar etanol yang dihasilkan semakin tinggi sehingga dapat dilihat lebih jelas pengaruh ergosterol.

DAFTAR PUSTAKA

- Azizah, R. 2014. **Kajian penggunaan *Tween80*TM pada pelbagai konsentrasi nira nipah kental dalam proses fermentasi bioetanol**. Sikripsi Fakultas Pertanian Universitas Riau. Pekanbaru.
- Boulton, C. and D. Quain. 2001. In **Biochemistry of fermentation. Brewing yeast and fermentation** (pp. 69-142). Blackwell Science. London.
- Casey, G. P., C. A. Magnus and W. M. Ingledew. 1984. **High-gravity brewing: effects of nutrition on yeast composition, fermentation ability and alcohol production**. Journal Applied and Environmental Microbiology 48 (3): 639-646.
- Chandel, A. K., R. K. Kapoor, and R. Rudravaram. 2006. **Production of bioetanol from *Typha latifolia* enzymatic hydrolysates under batch and fed batch fermentation condition**. Journal Fuel 6: 3317.
- Draphco, C.M., N.P. Nhuan, and T.H. Walker. 2008. **Biofuels Engineering Process Technology**. The McGraw-Hill Companies, Inc. USA.
- Dziugan, P., M. Balcerek, K. Pielech-Przybylska and P. Patelski. 2013. **Evaluation of the fermentation of high gravity thick sugar beet juice worts for efficient bioethanol production**. Journal Biotechnology for biofuels 6 (1): 158.
- Feng, J., Y. Zeng, C. Ma, X. Cai, Q. Zhang, M. Tong, B. Yu, and P. Xu. 2006. **The surfactant *tween 80* enhances biodesulfurization**. Journal Applied and Environmental Microbiology 72 (11): 7390-7393.
- Guimaraes, P. M. R., H. Virtanen, and J. Londesborough. 2006. **Direct evidence that maltose transport activity is affected by lipid composition of brewer's yeast**. Journal of the Institute of Brewing 112 (3): 203-209.

- Laopaiboon, L., P. Thanonkeo, S. Naunpheng, P. Jaisil, and P. Laopaiboon. 2007. **Ethanol production from sweet shorgum juice in batch and fed batch fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*** TISTR 5048. Journal Microbiology and Biotechnology 23 (10): 1497-1501.
- Liu, C. G., Y. H. Lin, and F. W. Bai. 2011. **Ageing vessel configuration for continuous redox potential-controlled very-high-gravity fermentation.** Journal of Bioscience and Bioengineering 111 (1): 61-66.
- Pham T.N.L., N. H. D. Doan, and V. V. M. Le. 2010. **Using fed-batch fermentation in very high gravity brewing: Effects of *Tween80*TM and ergosterol supplementation on fermentation performance of immobilized yeast in calcium alginate gel.** International Food Research Journal 17: 995-1002.
- Restuhadi, F. Djamin, B. Idris, A. Chairul, dan Hadi, S. 2012. **Pemanfaatan Potensi Nira Nipah dalam Merevitalisasi Industri Bioetanol di Kabupaten Bengkalis Provinsi Riau.** Universitas Riau. Pekanbaru.
- Sudarmadji, S., B. Haryono, dan Suhardi. 1997. **Prosedur Analisa Untuk Bahan Makanan dan Pertanian.** Liberty. Yogyakarta.
- Tamunaidu, P., T. Kakihira, H. Miyasaka, and S. Saka. 2011. **Prospect of Nipa Sap for Bioethanol Production.** Springer. Jepang.
- Tran, Q. H., T. T. Nguyen, V. V. M. Le and K. A. Hoang. 2010. **Effect of *Tween80*TM and ergosterol supplementation on fermentation performance of the immobilized yeast in high gravity brewing.** International Food Research Journal 17: 309-318.